

## Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário

**Silvana Ohse<sup>1\*</sup>**

**Roberto Bianchini Derner<sup>2</sup>**

**Renata Ávila Ozório<sup>3</sup>**

**Maurício Villela da Costa Braga<sup>3</sup>**

**Paulo Cunha<sup>4</sup>**

**Claudia Pavan Lamarca<sup>4</sup>**

**Márcia Estevão dos Santos<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Campus Uvaranas  
Av. Carlos Cavalcanti, 4748, CEP 84030-900, Ponta Grossa – PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

<sup>3</sup>Curso de Engenharia de Aqüicultura, UFSC

<sup>4</sup>CENPES/Petrobrás

\*Autor para correspondência  
sohse@uepg.br

Submetido em 18/09/2007

Aceito para publicação em 13/03/2008

### Resumo

Com o objetivo de avaliar o crescimento de diferentes microalgas, testou-se nove espécies marinhas (*Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Isochrysis* sp.) e uma de água doce (*Chlorella vulgaris*), em cultivo autotrófico estacionário, utilizando-se recipientes contendo 800mL de meio de cultura, iluminação constante fornecendo densidade de fluxo de fótons nos cultivos em torno de  $150\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e aeração constante. O experimento foi conduzido em sala de cultivo sob delineamento em blocos casualizados no tempo com três repetições. A espécie *Nannochloropsis oculata* foi a que apresentou maior valor de densidade celular máxima, porém num período maior de tempo e com uma velocidade de crescimento menor que as demais espécies estudadas. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao seu tamanho diminuto das células, necessitando de um número maior de células/mL para que se inicie a competição por luz, nutrientes e espaço. Já a espécie *Thalassiosira fluviatilis*, apesar de ter apresentado um dos menores valores de densidade celular máxima, esta alcançou o pico em menor tempo e com velocidade de crescimento maior. A única espécie de água doce (*Chlorella vulgaris*) apresentou baixo desempenho para todas as variáveis analisadas.

**Unitermos:** microalgas, cultivo, crescimento autotrófico

## Abstract

**Growth of microalgae in autotrophic stationary systems.** In this paper we evaluate the growth of nine marine microalgae species (*Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricoratum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* and *Isochrysis* sp.) and one freshwater species (*Chlorella vulgaris*) under stationary autotrophy conditions, using erlenmeyers flasks with 800mL of culture medium exposed to constant light intensities providing a photon flux density of about  $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $25\pm 2^\circ\text{C}$  temperature and constant air flow. The experiment was carried out in a controlled environment considering a block delineating randomized over time with three replicates. The *Nannochloropsis oculata* showed the highest value of maximum cellular density, but with a longer period of time and a lower growth rate. This was probably due to its tiny cell size, demanding a large number of cells per volume to attain its optimum conditions for light, nutrients, water and atmospheric carbon dioxide. In addition, in spite of showing one of the lowest values of maximum cellular density, *Thalassiosira fluviatilis* was the species that reached its maximum in a short period of time at the highest growth rate. *Chlorella vulgaris* was the only freshwater species tested and it showed the poorest performance for all the variables analyzed in the current study.

**Key words:** microalgae, culture, autotrophic growth

## Introdução

As microalgas pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos, predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, que podem formar colônia, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. São caracterizadas pela presença de pigmentos, responsáveis por coloração variada e por mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (Raven et al., 2001).

Segundo Henrikson (1994) e Vonshak (1997) a biomassa da microalga *Spirulina* (*Arthrospira*) já era utilizada na produção de alimentos pelos povos antigos que habitavam margens de lagos da África e do México. Todavia, somente no século XX, pesquisadores desenvolveram tecnologias de cultivo, usando tanques abertos, fotobiorreatores fechados (PBRs) e reatores (tipo fermentadores), que permitiram a sua produção comercial (Olaizola, 2003). Segundo esse mesmo autor, as microalgas são consideradas uma fonte potencialmente rica de vários produtos químicos, os quais podem ser aplicados na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, bem com, na obtenção de biocombustíveis. O cultivo pode ser aberto ou fechado, circulante ou estacionário. No caso de tanques abertos, reatores do tipo fermentadores e recipientes pequenos utilizados na manutenção de cultivos, ou mesmo, aqueles utilizados

para aumentar o volume de inóculo geralmente são do tipo estacionário (Borowitzka e Borowitzka, 1988; Richmond, 2004).

O cultivo de microalgas pode ser considerado um sistema biológico muito eficiente no armazenamento de energia solar, através da produção de compostos orgânicos via processo fotossintético, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento mais rápido que as plantas terrestres, possibilitando maior rendimento de biomassa (Vonshak, 1990). As plantas apresentam composição química diferenciada para cada órgão, já as microalgas são organismos unicelulares, apresentando a mesma composição química em toda a biomassa numa cultura (Raven et al., 2001). Apesar dessas vantagens e da flexibilidade (operacional e tecnológica) do sistema de produção de biomassa, as unidades produtivas necessitam de investimentos altíssimos, tanto em relação ao custo de implantação quanto à produção de biomassa (nutrientes, energia, mão-de-obra, separação etc.), além disso, há risco de contaminação dos cultivos (Richmond, 1990 e 2004; Borowitzka, 1994; Molina et al., 1995).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (Falkowski e Raven, 1997). Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada, bem como com a possível influência

de organismos contaminantes. Quanto aos fatores físico-químicos que afetam o crescimento das microalgas são principalmente reportados estudos sobre luz, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Guillard, 1975; Richmond, 2004).

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular de água doce pertencente à classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae (Hoek et al., 1995). Apresenta forma de vida unicelular ou colonial, e pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*,  $\beta$ -caroteno e xantofilas. A principal forma de reserva é o amido, porém sob certas condições podem armazenar óleo. A reprodução pode ser por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual (Hoek et al., 1995; Lee, 1995; Falkowski e Raven, 1997; Esteves, 1998; Tomaselli, 2004).

As espécies *Tetraselmis suecica* e *T. chuii* são algas unicelulares flageladas, pertencente à classe Prasinophyceae, ordem Chlorodendrales e família Chlorodendracea (Hoek et al., 1995; Tomaselli, 2004). Habitam ambientes marinhos, exibem altas taxas de crescimento e são usadas em cultivos como alimento para larvas de moluscos bivalves (Laing e Ayala, 1990). Sob condições de cultivo mixotrófico, podem alcançar densidade celular considerável (Xie et al., 2001).

A espécie *Nannochloropsis oculata* pertence à classe Eustigmatophyceae (Xanthophyceae), ordem Eustigmatales e família Monopsidaceae (Hoek et al., 1995). Podem ser produzidas em cultivo "batch" ou estacionário, sendo usadas na cadeia alimentar de rotíferos (Okauchi, 1991).

A espécie *Chaetoceros muelleri* é uma alga unicelular marinha pertencente à classe Bacillariophyceae, ordem Centrales e família Chaetoceraceae (Hoek et al., 1995). Já as espécies *Thalassiosira pseudonana* e *T. fluviatilis* pertencem à família Thalassiosiraceae (Hoek et al., 1995). A espécie *Phaeodactylum tricorutum* pertence à ordem Bacillariales e família Phaeodactylaceae (Hoek et al., 1995). As algas desta classe são também conhecidas como diatomáceas, responsáveis por cerca de 25% da produção primária no planeta, tornando-se o maior produtor de biomassa (Raven et al., 2001).

As espécies *Isochrysis galbana* e *Isochrysis* sp. são algas unicelulares marinhas pertencentes à clas-

se Prymnesiophyceae, ordem Isochrysidales e família Isocrysidaceae (Hoek et al., 1995; Tomaselli, 2004). Apresentam boas características nutritivas, sendo de substancial interesse na aquicultura, principalmente na alimentação de moluscos, peixes e crustáceos em estágios iniciais de crescimento (Bougaran et al., 2003).

Visando a obtenção de informações relativas ao cultivo de diferentes espécies de microalgas considerando as mesmas condições experimentais foi desenvolvido este estudo, com o objetivo de determinar o crescimento de dez espécies de microalgas cultivadas autotroficamente sob regime estacionário.

## Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido em sala de cultivo, no Laboratório de Biotecnologia Alimentar (BIOTEC), Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As microalgas estudadas foram: *Chlorella vulgaris* (microalga de água doce, cepa oriunda da Universidade Federal de São Carlos), *Nannochloropsis oculata*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Isochrysis* sp. (microalgas marinhas, de cepas oriundas do Laboratório de Camarões Marinhos/UFSC). O experimento foi delineado em blocos casualizados no tempo, com três repetições.

A temperatura da sala de cultivo foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e as culturas foram desenvolvidas com iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes de 40 W), sendo submetidas a fotoperíodo integral e radiação de  $\pm 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no primeiro dia de cultivo e de  $\pm 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a partir do segundo dia. Para o cultivo da espécie *Chlorella vulgaris*, de água doce, foi utilizado o meio de cultura W.C. (Tabela 1) e, para as espécies marinhas o meio F/2 Guillard (Tabela 2), numa salinidade de 29 (29‰). As culturas foram mantidas com agitação (aeração) constante, com um fluxo de ar atmosférico de  $0,3 \text{L min}^{-1}$ .

TABELA 1: Meio de cultura W.C., modificado de Guillard e Lorenzen (1972).

Reagentes	Solução-estoque (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Meio de cultura
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36,8	1mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	37,0	1mL
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	12,6	1mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	11,4	1mL
NaNO <sub>3</sub>	85,0	1mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	21,2	1mL
Solução de Ferro	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada); Na <sub>2</sub> EDTA = 4,36; FeCl <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O = 3,15	1mL
Solução de micronutrientes	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada) CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 0,01; ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O = 0,022; CoCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O = 0,01; MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O = 0,18; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O = 0,006; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> = 1,0	1mL
Solução de vitaminas	(g 1000 mL <sup>-1</sup> de água destilada) Tiamina HCl = 0,1; Biotina = 0,0005	1mL
Água destilada		1000mL

Correção do pH para 6,5 com solução de HCl 10% (aproximadamente 2 mL).

TABELA 2: Composição do Meio F/2 modificado de Guillard (1975), empregado no cultivo de microalgas marinhas.

<b>1. Solução de nitrato</b>		
• NaNO <sub>3</sub>		150,0g
• FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O		8,0g
• EDTA Na <sub>2</sub>		10,0g
• Sol. Traços de Metais		2,0mL (de cada solução)
• Água destilada		a 1,0L
(Adicionar 0,65 mL para cada litro de água do mar)		
<b>Solução de traços de metais:</b>	• ZnCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,65g
	• CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,50g
	• (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,60g
	• CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,47g
	• MnCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	27,0g
	• Água destilada para cada solução	a 150,0mL
<b>2. Solução de fosfato</b>		
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O		16,0g
• Água destilada		a 1,0L
(Adicionar 0,65 mL para cada litro de água do mar)		
<b>3. Solução de silicato</b>		
• Silicato de sódio (H-300, QUIMIDROL)		80,0g
• Água destilada		a 1,0L
(Adicionar 1,0 mL para cada litro de água do mar)		
<b>4. Solução de TRIS</b>		
• Tris (Hidroximetil) Aminometano		50,0g
• Ácido clorídrico PA		35,0mL
• Água destilada		470,0mL
(Adicionar 5,0mL para cada litro de água do mar, quando houver a necessidade de esterilizar o meio em autoclave)		
<b>Vitaminas: Biotina:</b> 0,1g para 100mL, deste adicionou-se 1mL na solução de Fosfato. <b>Cianocobalamina:</b> 0,1g para 100mL, deste adicionou-se 1mL na solução de Fosfato. <b>Tiamina:</b> 0,2g, adicionados na solução de Fosfato.		

As curvas de crescimento foram elaboradas com a densidade celular diária da média das três repetições de cada tratamento ou espécie estudada. Com auxílio do programa estatístico Curveexpert foram ajustadas pela aproximação à curva logística segundo Pindich e Rubinfeld (1981), aplicando-se a seguinte fórmula:  $Y = P_1 / (1 + (P_2 - N_0 / N_0) \cdot e^{-kt})$ , onde: Y = densidade celular (cel./L);  $P_1$  e  $P_2$  = primeiro e segundo parâmetros da curva logística, respectivamente;  $N_0$  = densidade celular inicial (cel./L); k = velocidade de crescimento ( $d^{-1}$ ); t = tempo (em dias). Os dados das curvas obtidas e aqueles das curvas ajustadas foram considerados correspondentes quando o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi igual ou superior a 0,80 (Costa Neto, 1977).

A velocidade de crescimento específico (k) que representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia), foi determinada através da seguinte equação, citada por Stein (1973):  $k = (3,322 / (T_2 - T_1)) \cdot (\log N_2 / N_1)$ , onde: k = velocidade de crescimento; 3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10;  $(T_2 - T_1)$  = intervalo de tempo em dias;  $N_1$  = densidade celular inicial;  $N_2$  = densidade celular final; Log = Logaritmo em base 10. A velocidade ou taxa de crescimento específica de cada unidade experimental foi obtida considerando o dia de cultivo no qual a população alcançou a máxima densidade celular.

Para avaliar os parâmetros de crescimento (densidade celular máxima alcançada, tempo de cultivo até alcançar a máxima densidade e velocidade de crescimento) foram desenvolvidas análises de variância (ANOVA) simples com  $P < 0,05$ , e teste de separação de médias de Tukey com  $P < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

O crescimento das microalgas foi determinado pelo incremento diário da densidade celular de cada uma das unidades experimentais. Na figura 1 estão representadas as curvas de crescimento para as 10 espécies estudadas. A densidade celular inicial nas culturas de *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp., *Phaeodactylum tricornerutum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* foi de  $1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, enquanto para *Thalassiosira fluviatilis*, *Tetraselmis*

*suecica* e *Tetraselmis chuii* foi de  $1 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> e, para *Nannochloropsis oculata* foi de  $1 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. As curvas foram construídas em diferentes escalas, uma vez que o cultivo foi iniciado com diferentes densidades em função das diferenças de tamanho.

A reprodução gráfica se refere à densidade diária da média das três repetições para cada uma das espécies estudadas. Os pontos indicam os valores médios obtidos e a linha contínua descreve a curva ajustada, segundo regressão, através do modelo logístico [ $Y = a / (1 + b \exp^{-cx})$ ]. Em cada uma das curvas são apresentados os parâmetros (a e b, onde a determina o ponto onde a linha corta o eixo Y e b corresponde à inclinação da reta) da curva, bem como o coeficiente de determinação  $r^2$ . Observa-se que para todas as espécies as curvas correspondem ao modelo proposto e que os coeficientes de determinação variaram entre 0,96 a 0,99, indicando que existe correspondência entre os dados obtidos e aqueles da curva ajustada.

Os desenhos das curvas foram bastante semelhantes, ficando, entretanto, perceptíveis algumas diferenças, por exemplo, as espécies *Thalassiosira pseudonana* e *Thalassiosira fluviatilis* demonstraram fase exponencial bastante acentuada, entrando na fase estacionária no terceiro e quarto dia, respectivamente (Figura 1). As espécies *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Isochrysis* sp. e *Chaetoceros muelleri* apresentaram fase exponencial mais tênue, levando mais tempo para entrar na fase estacionária (9, 6, 7 e 7 dias, respectivamente), sendo que as demais (*Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis chuii*, *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*) apresentaram a inclinação da curva mediana. Entretanto, deve-se levar em conta a escala em que foi construída cada curva, a qual considerou sempre a densidade celular inicial e máxima atingida.

Na tabela 3 pode-se observar que houve variação significativa ( $P < 0,05$ ) entre os valores de densidade celular máxima (DCM) entre as espécies estudadas. A espécie *Nannochloropsis oculata* apresentou a maior dado médio para o parâmetro DCM, o que se deve ao seu tamanho reduzido em relação às outras espécies estudadas. Foi por esta razão que, iniciou-se o cultivo da *Nannochloropsis oculata* com densidade celular de  $100 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, valor esse, 10 vezes maior que o



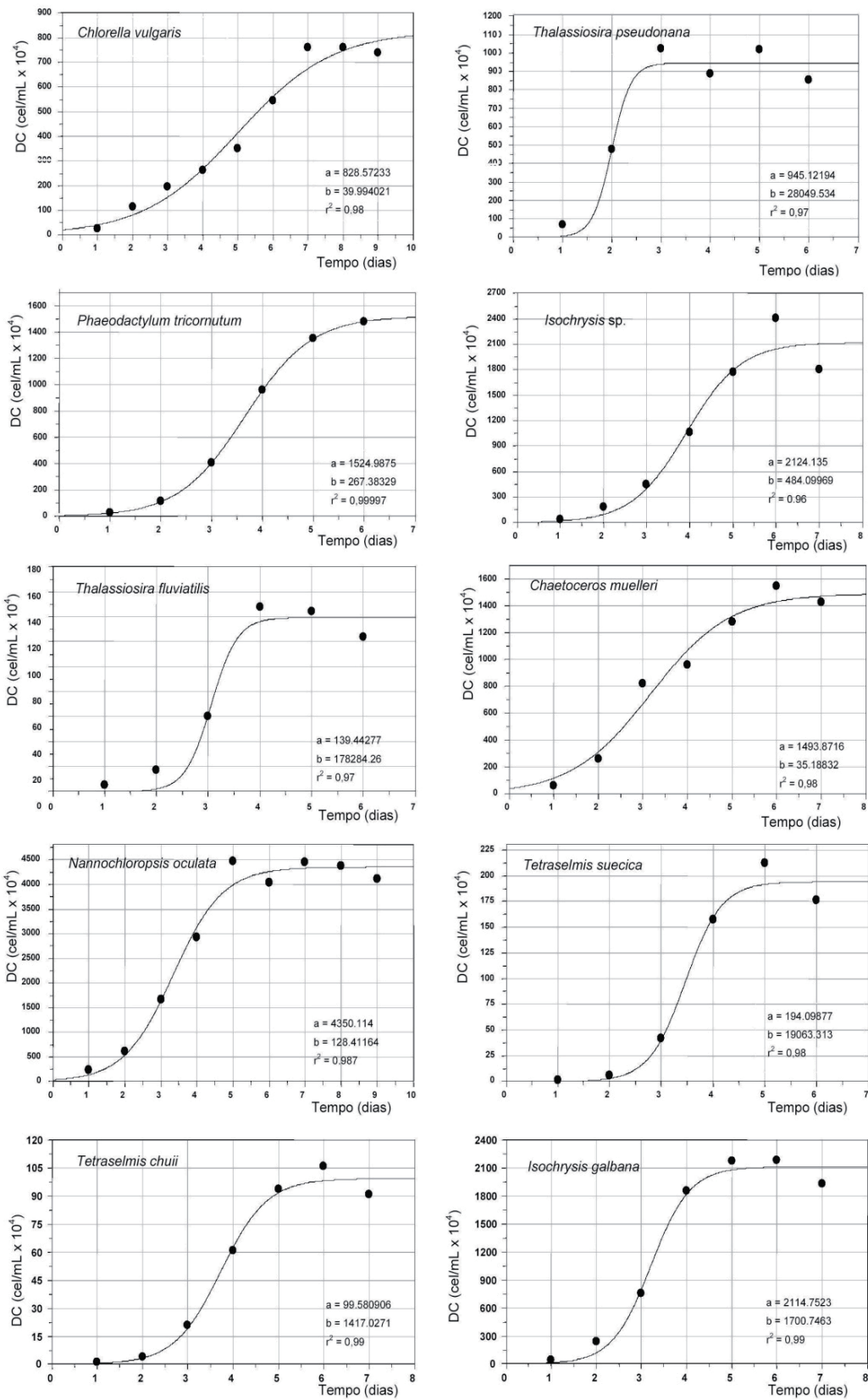


FIGURA 1: Curvas de crescimento das dez espécies cultivadas.

utilizado para as espécies *Isochrysis galbana*, *Isochrysis* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricorutum* e *Thalassiosira pseudonana* e 100 vezes superior ao utilizado para as espécies *Thalassiosira fluviatilis*; *Tetraselmis suecica* e *Tetraselmis chuii*. Apesar da alta densidade celular, o rendimento de cultivos contínuos de *Nannochloropsis* foi significativamente reduzido, devido à sensibilidade a fatores que inibem o crescimento, por exemplo, produção de autoinibidores, fenômeno comum em culturas com altas densidades celulares (Rodolfi et al., 2003).

As espécies *T. fluviatilis*, *T. suecica* e *T. chuii* apresentaram os menores valores de DCM, provavelmente por apresentarem tamanho celular superior às demais espécies estudadas, com isso, completam seu ciclo de crescimento em densidades celulares menores. Todavia, não diferiram significativamente das espécies *T. pseudonana* e *C. vulgaris*. As espécies *I. galbana* e *Isochrysis* sp. apresentaram valores intermediários de

DCM, semelhantes as espécies *C. muelleri* e *P. tricorutum* e estas não diferiram significativamente das espécies *T. pseudonana* e *C. vulgaris*.

Renaud et al. (1999), estudando o crescimento de 18 espécies de microalgas, sob condições controladas (pH  $8,3 \pm 0,2$ ; temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , radiação de  $80 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e salinidade  $25 \pm 1\text{‰}$ ), encontraram tamanho  $8,3$  comprimento x  $5,5 \mu\text{m}$  largura e densidade de  $2,89 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  para *Chaetoceros* sp.;  $10,9 \times 7,5 \mu\text{m}$  e densidade de  $1,82 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  para *Tetraselmis* sp. e  $6,4 \times 6,4 \mu\text{m}$  e densidade de  $1,69 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  para *Isochrysis* sp.. Neste experimento o tamanho da espécie *C. muelleri* foi inferior ao encontrado para o mesmo gênero, porém a densidade celular na fase exponencial tardia foi muito superior. O mesmo acontece para as espécies *Isochrysis* sp. e *I. galbana*, porém para *T. suecica* e *T. chuii* tanto o tamanho quanto à densidade estão mais próximos aos valores encontrados pelos referidos autores.

TABELA 3: Densidade celular inicial (DI). Densidade celular máxima (DCM). Dia de cultivo em que atingiu a densidade celular máxima (DCDCM). Velocidade de crescimento (k) em divisões por dia. Média de três repetições.

Espécie	DI	DCM	Tamanho celular ( $\mu\text{m}$ )		DCDCM	Divisões por dia
		Células x $10^4 \text{ mL}^{-1}$	Comprimento	Largura	(dias)	
<i>Nannochloropsis oculata</i>	100	5.540,50 (569,59) a	2,03 (forma esférica)		7,00 (2,00) a	0,88 (0,28) b
<i>Isochrysis galbana</i>	10	2.497,67 (604,66) b	5,18	3,15	5,00 (1,00) abc	1,62 (0,30) a
<i>Isochrysis</i> sp.	10	2.412,33 (530,27) b	4,8	3,15	6,00 (0,00) abc	1,32 (0,06) ab
<i>Chaetoceros muelleri</i>	10	1.615,33 (386,50) bc	5,33	3,15	5,67 (0,58) abc	1,30 (0,13) ab
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	10	1.482,50 (166,15) bc	15,68	2,33	6,00 (0,00) abc	1,20 (0,03) ab
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	10	1.075,33 (426,64) cd	5,25	3,52	4,00 (1,00) c	1,72 (0,30) a
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	772,00 (108,17) cd	ND	ND	6,67 (0,58) ab	0,94 (0,05) b
<i>Tetraselmis suecica</i>	1	212,33 (60,35) d	9,51	5,7	5,00 (0,00) abc	1,54 (0,08) a
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	1	164,00 (18,68) d	10,88	7,2	4,33 (0,58) bc	1,72 (0,24) a
<i>Tetraselmis chuii</i>	1	110,00 (5,00) d	11,93	8,03	5,33 (0,58) abc	1,28 (0,12) ab
Média geral		1.588,20			5,50	1,341

\*Tratamentos com médias não seguidas pela mesma letra diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro, com desvio padrão entre parênteses. ND = Não determinada

Da mesma forma, Renaud et al. (2002) estudando o efeito da temperatura sobre o crescimento de microalgas (pH 8,3, radiação de  $80\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e salinidade de 25‰), obtiveram quando da temperatura de 25°C, densidade de  $3,98 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> para *Chaetoceros* sp. e  $5,78 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> para *Isochrysis* sp., valores estes muito inferiores aos encontrados neste experimento.

Estudando o efeito da iluminação sobre o crescimento celular, Rocha et al. (2003) constataram valor médio densidade celular para *Nannochloropsis gaditana* de aproximadamente  $55 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> quando da iluminação contínua e cerca de  $23 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> quando do ciclo 12 horas de luz e 12 de escuro em 13 dias de cultivo, determinada através do método turbidimétrico. Resultados estes que comprovam o maior crescimento celular em função do aumento do período de iluminação. O valor encontrado pelos referidos autores, quando da iluminação contínua, foi muito semelhante à densidade celular máxima encontrada no presente estudo para a espécie *Nannochloropsis oculata*, porém em 7 dias de cultivo.

O modelo de crescimento microalgal é difícil de ser avaliado, uma vez que a composição celular e o momento de coleta das amostras afetam consideravelmente a estimação da densidade celular. Este problema é aumentado em soluções diluídas e com pequenos tamanhos celulares, assim como a *Nannochloropsis* sp. (2-4µm) (Rocha et al., 2003). O tamanho encontrado para *N. oculata* encontra-se dentro da faixa citada pelos referidos autores, o qual foi de 2,03 µm.

Para se iniciar um cultivo contínuo de microalgas geralmente inclui-se um cultivo preliminar estacionário (batch) para a obtenção da densidade celular suficiente. Bougaran et al. (2003) comparando o regime contínuo de cultivo e o estacionário, utilizando a microalga *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti* (T-Iso) e densidade inicial de  $5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, observaram que em ambos os cultivos alcançaram a fase estacionária entre 6 a 8 dias após a inoculação. Em ambos os sistemas de cultivo a densidade celular média alcançada variou de  $7,7$  a  $9,0 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. No presente estudo os valores de densidade celular média para *Isochrysis galbana* e *Isochrysis* sp. foram de  $24,98$  e  $24,12 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> aos 6 e 5 dias após inoculação, respectivamente, sendo cerca de três vezes superior ao encontrados pelos referidos autores.

Valenzuela-Espinoza et al. (2002), comparando o crescimento de *I. galbana* (T-Iso) em meio de cultura f/2 (Guillard, 1975) e com adição de fertilizantes agrícolas, obtiveram após sete dias de cultivo valores médios de densidade de  $5,16$  e  $5,19 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> para o cultivo com fertilizantes e meio f/2, respectivamente, com uma taxa de crescimento de  $0,6$  d<sup>-1</sup>. Os valores de densidade celular, obtidos para *Isochrysis galbana* e *Isochrysis* sp., alcançados ao cinco e seis dias de cultivo, respectivamente, neste estudo, foram superiores aos apresentados pelos referidos autores. No entanto, a taxa ou velocidade de crescimento em número de divisões por dia foi semelhante. Foram superiores também aos dados obtidos por Poisson e Ergon (2001) testando dois meios de cultura (Jones e Provasoli 1/3) e três períodos de coleta (4, 8 ou 14 de cultivo) para densidade celular, variando de  $241,3$  a  $578 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>.

Em cultivo estacionário sob condições controladas de temperatura de  $18\pm 1^\circ\text{C}$ , radiação de  $115 \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , 12:12 horas luz/escuro e densidade inicial de  $2,5 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, Fidalgo et al. (1998) encontraram para *Isochrysis galbana* densidades celulares variando de  $23$  a  $29 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> em função da fonte de nitrogênio, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho para *Isochrysis galbana* e *Isochrysis* sp..

Testando diferentes regimes de luz, Tzovenis et al. (2003) encontraram o valor máximo de  $3,96 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> para *Isochrysis galbana*, quando de iluminação contínua, radiação de  $150\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , temperatura de 26°C e adição de 2% de CO<sub>2</sub>. Valor este superior aos encontrados neste experimento, para a mesma espécie e também para *Isochrysis* sp., os quais rearranjados foram de  $2,412$  e  $2,498 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Estudando o crescimento de *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* sp., Pernet et al. (2003), em 0,5, 18 e 170 litros de meio de cultura até o oitavo dia de cultivo, obtiveram os respectivos valores variando de  $3$  a  $12 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, aumentando com o aumento do volume de cultivo. Já para *Isochrysis* sp., a densidade variou de  $4$  a  $10 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, com maior rendimento no verão do que no inverno. Em ambos os gêneros, os valores máximos encontrados pelos autores acima citados, são inferiores aos atingidos no estudo em questão.



Em um experimento utilizando-se 1,5 litro de meio f/2, temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $120 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e borbulhamento contínuo de ar enriquecido com  $\text{CO}_2$ , Voltolina et al. (1998) encontraram para *Chaetoceros* sp. densidades celulares aos 4 e 8 dias de cultivo de  $1,19$  e  $1,63 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, quando de pré-aclimatação do inóculo e  $1,92$  e  $2,66 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , quando em fase exponencial de crescimento. Para *Phaeodactylum tricorutum* esses valores foram  $4,08$  e  $6,76 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  e  $7,15$  e  $4,68 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. A espécie *Chaetoceros muelleri* apresentou densidade celular máxima de  $16,15 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  e *Phaeodactylum tricorutum*,  $14,82 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , valores esses muito superiores aos encontrados pelos referidos autores. As diferenças podem ser explicadas pelas diferenças das condições experimentais, uma vez que se utilizou temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , radiação de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e borbulhamento contínuo de ar sem injeção de  $\text{CO}_2$ , pois, em experimento preliminar, percebeu-se que havia redução muito rápida do pH da cultura em função do aumento deste elemento na cultura, entre outras.

López-Elías et al. (2005) iniciaram o cultivo de *Chaetoceros muelleri* com  $0,2 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  em sistema estacionário protegido, determinando a densidade celular após 42 horas, encontraram os seguintes valores:  $1,76 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  na primavera;  $2,02 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  no verão;  $1,26 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  no outono e  $1,71 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  no inverno. Em cultivo do tipo batch ou estacionário utilizando fotobiorreator, Krichnavaruk et al. (2005) encontraram para a *Chaetoceros calcitrans* a densidade celular máxima de  $8,8 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  quando da fase estacionária. Neste foi de  $2,63 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  após 48 horas de cultivo e  $16,15 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  após 136 horas de cultivo (Tabela 3). No entanto, valores superiores foram encontrados por Göksan et al. (2003), avaliando a densidade celular em função de variações na iluminação, onde o valor máximo obtido no sétimo dia de cultivo foi  $49,08 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$  para *Chaetoceros muelleri*.

Avaliando a composição química de *Chaetoceros* sp. em diferentes condições de luz, Saavedra e Voltolina (1994) obtiveram como densidade celular máxima  $7,8 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , quando da radiação  $498 \mu\text{mol m}^{-2}$

$\text{s}^{-1}$ , acima disso houve fotoinibição. Neste experimento, foi obtido mais que o dobro da densidade, quando da radiação  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

O crescimento de *Chlorella vulgaris* foi avaliado em biorreator tubular, mantendo em  $25^\circ\text{C}$  em frascos contendo 100mL de cultura, radiação de  $76 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  com 16h de luz e agitação de 60rpm, Scragg et al. (2002) obtiveram densidade celular máxima de  $7,7 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , corroborando com o valor obtido neste para a mesma espécie.

Nieves et al. (2005) cultivaram *Tetraselmis suecica* em diferentes meio de cultura, obtiveram densidades celulares variando de  $0,6$  a  $0,7 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , enquanto que o controle após 5 dias da inoculação apresentou densidade de  $1,3 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , valores estes inferiores aos encontrados neste estudo ( $2,12 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ).

Em recipiente contendo 4,3 litros de meio a  $18^\circ\text{C}$ ,  $81 \pm 4 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 12:12 h de luz:escuro, densidade inicial de  $5,5 \times 10^5$  cel  $\text{mL}^{-1}$ , Fábregas et al. (1994) obtiveram para *Dunaliella tertiolecta*, densidade celular máxima de aproximadamente  $13 \times 10^6$  cel  $\text{mL}^{-1}$ . Valor superior aos valores obtidos neste trabalho para as espécies *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis suecica*, *T. Chuii* e *Thalassiosira fluviatilis*, o que se deve, provavelmente ao maior tamanho celular apresentado por estas espécies.

Analisando-se os valores médios encontrados para as 10 espécies estudadas, pode-se concluir que existe uma grande variação entre elas quanto à densidade celular, o que é resultante provavelmente das diferenças de tamanho, bem como o esgotamento dos nutrientes do meio de cultura, não suportando maiores densidades. A partir desse momento passa a haver competição não só por nutrientes, mas por espaço e luz (autossombreamento).

A análise da variância revelou significância ( $P < 0,05$ ) para o parâmetro dia de cultivo em que atingiu a densidade celular máxima. A DCM foi alcançada em menos tempo pela *Thalassiosira pseudonana*, diferindo significativamente somente das espécies *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris*. As espécies que levaram mais tempo para obterem a DCM foram também as que apresentaram tamanho celular rela-

tivamente menor. Mesmo tendo iniciado o cultivo da *Nannochloropsis oculata* com densidade inicial de  $100 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>, superior a todas as outras espécies, a DCM foi atingida em um período maior de tempo que nas espécies *Thalassiosira fluviatilis* e *T. pseudonana*, não diferindo significativamente das demais espécies.

A DCM foi atingida no final da primeira semana, quando do cultivo estacionário, em *Dunaliella salina* (García-González et al., 2005). As espécies *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tri-cornutum* e *Isochrysis* sp., também apresentaram valor de DCM no final da primeira semana, sendo que as demais espécies apresentaram em menos tempo.

Em recipiente contendo 4,3 litros de meio a 18°C,  $81 \pm 4 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 12:12 h de luz:escuro, densidade inicial de  $5,5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, Fábregas et al. (1994) obtiveram para *Dunaliella tertiolecta*, densidade celular máxima no décimo dia de cultivo, período superior ao obtido neste para todas as espécies estudadas.

Análise da variância não revelou significância para blocos, revelando, no entanto, para tratamentos ( $P < 0,05$ ) para o parâmetro velocidade de crescimento (k) em divisões por dia. A tabela 3 apresenta os dados médios da velocidade de crescimento. O maior valor foi de  $1,72 \text{ d}^{-1}$  apresentado pelas espécies *Thalassiosira pseudonana* e *Thalassiosira fluviatilis*. Estas espécies, juntamente com *Isochrysis* sp. diferiram significativamente das espécies *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oculata*, não diferindo das demais. O menor valor foi de  $0,88$  apresentado pela espécie *Nannochloropsis oculata*.

Renaud et al. (2002) constataram maior taxa de crescimento para *Chaetoceros* sp. e *Isochrysis* sp. na faixa de temperatura 27 a 30°C, cujo valor foi de  $0,87$  e  $0,97$  divisões por dia, respectivamente, valores estes, inferiores aos apresentados na Tabela 3 para os mesmos gêneros. Já Renaud et al. (1999), estudando o crescimento de 18 espécies de microalgas, sob condições controladas (pH  $8,3 \pm 0,2$ ; temperatura  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , densidade de fluxo de fótons de  $80 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e salinidade  $25 \pm 1\text{‰}$ ), encontraram  $0,56$ ;  $0,39$  e  $0,47$  divisões por dia para *Chaetoceros* sp. (*Bacillariophyceae*), *Tetraselmis* sp. (média de duas espécies – *Prasinophy-*

*ceae*) e *Isochrysis* sp. (*Prymnesiophyceae*), respectivamente, sendo que o maior valor foi  $0,73 \text{ d}^{-1}$  apresentado pela *Bacillariophyceae*, *Skeletonema* sp.. No presente, os valores foram superiores para todas os respectivos gêneros, bem como a média geral. Todavia, as taxas de crescimento reportadas para diatomáceas temperadas por Chen e Durbin (1994) foram similares a superiores, variando de  $1,7$  a  $3,8$  divisões por dia, particularmente por se tratar de cepas diferentes, cultivadas sob condições ambientais distintas.

López-Elías et al. (2005) determinaram a taxa de crescimento para *Chaetoceros muelleri*, encontrando valores variando entre  $1,2$  a  $2,7 \text{ d}^{-1}$  em sistema estacionário protegido e  $1,7$  a  $2,9 \text{ d}^{-1}$  em sistema estacionário a céu aberto, após 24 horas de cultivo, em função das estações do ano. A velocidade de crescimento encontrada neste para *Chaetoceros muelleri* foi de  $1,30 \text{ d}^{-1}$ , encontrando-se dentro da faixa obtida para o sistema estacionário protegido e abaixo da obtida em sistema estacionário a céu aberto pelos referidos autores, lembrando que o cálculo foi realizado levando em consideração o tempo em dias que levou para atingir a DCM. Valores inferiores foram encontrados por Rajadurai et al. (2005), para as diatomáceas *Chaetoceros wighami* e *Amphora coffeaeformis*, produzidas em meio de cultura Guillard f/2, irradiância de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , as quais apresentaram as respectivas taxa de crescimento em divisões por dia  $\pm 0,95$  e  $\pm 0,72$ , taxas que decresceram com o aumento da temperatura.

Para a diatomácea *Thalassiosira weissflogii*, Reinfelder et al. (2000) obtiveram taxas de crescimento variando de  $1$  a  $1,5 \text{ d}^{-1}$  em função do tratamento aplicado. Amplitude esta, inferior aos valores obtidos neste para os mesmos gêneros.

Avaliando o crescimento de *Chlorella vulgaris* em biorreator tubular, temperatura de  $25^\circ\text{C}$  em frascos contendo 100mL de cultura, intensidade luminosa de  $76 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  com 16h de luz e agitação de 60rpm, Scragg et al. (2002) constataram máxima taxa de crescimento de  $0,69 \text{ d}^{-1}$ , valor este inferior ao encontrado neste trabalho para a mesma espécie.

Tzovenis et al. (2003), encontraram taxa de crescimento específica de  $1,25 \text{ d}^{-1}$ , para *Isochrysis galbana*,

valor este, inferior ao obtido neste, para *Isochrysis galbana* e para *Isochrysis* sp.. Valor inferior foi constatado também por Poisson e Ergon (2001) para *Isochrysis galbana*, quando do uso do meio de cultura Provasoli 1/3, cujo valor foi de 0,44 d<sup>-1</sup>. Grima et al. (1994) também obtiveram taxa de crescimento inferior para *Isochrysis galbana*, a qual foi de 0,38 d<sup>-1</sup> ao sétimo dia de cultivo em sistema semicontínuo. Em recipiente contendo 4,3 litros de meio a 18°C, 81 ± 4μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 12:12 h de luz: escuro, densidade inicial de 5,5 x 10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup>, Fábregas et al. (1994) constataram para *Dunaliella tertiolecta*, taxas de crescimento variando de 0,9 a 1,1 d<sup>-1</sup>.

A espécie *Nannochloropsis oculata* foi a que apresentou maior valor de DCM, porém num período maior de tempo e com uma velocidade de crescimento menor que as demais espécies estudadas. O que se deve, provavelmente, ao seu tamanho diminuto, necessitando de um número maior de células por mL de cultura para que se inicie a competição por luz, nutrientes e espaço. Já a espécie *Thalassiosira fluviatilis* apesar de ter apresentado um dos menores valores de DCM, alcançou-a em um período menor de tempo e com velocidade de crescimento maior. A única espécie de água doce (*Chlorella vulgaris*) apresentou baixo desempenho para todos os parâmetros avaliados.

Pode-se concluir que, tanto a densidade celular máxima quanto o tempo que leva para esta ser atingida, bem como a velocidade de crescimento variam muito, mesmo considerando a mesma espécie, e sob as mesmas condições (temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, composição do meio de cultura, tipo de cultivo, entre outros) de cultivo.

## Agradecimentos

À PETROBRÁS pelo auxílio financeiro. Ao Laboratório de Biotecnologia alimentar da UFSC pelo espaço físico. Ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC e ao Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG pelo fornecimento das cepas.

## Referências

- Borowitzka, M. A. 1994. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, **70**: 313-321.
- Borowitzka, M. A.; Borowitzka, L. J. (eds). 1988. **Micro-algal biotechnology**. Cambridge University, Cambridge, UK, 477pp.
- Bougaran, G.; Le Déan, L.; Lukomska, E.; Kaas, R.; Baron, R. 2003. Transient initial phase in continuous culture of *Isochrysis galbana* affinis *Tahiti*. **Aquatic Living Resources**, **16**: 389-394.
- Chen, C. Y.; Durbin, E. G. 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology – Progress Series**, **109**: 83-94.
- Costa Neto, P. L. O. 1977. **Estatística**. Edgar Blücher, São Paulo, Brasil, 64pp.
- Esteves, F. A. 1998. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª ed. Intelligência, Rio de Janeiro, Brasil, 602pp.
- Fábregas, J.; Ferrón, L.; Gamallo, Y.; Vecino, E.; Otero, A.; Herrero, C. 1994. Improvement of growth and cell productivity by aeration rate in cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. **Biorresource Technology**, **48**: 107-111.
- Falkowski, P. G.; Raven, J. A. 1997. **Aquatic photosynthesis**. Blackwell Science, Oxford, UK, 375pp.
- Fidalgo, J. P. C. A.; Torres, E.; Sukenikm A.; Herrero, C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**, **166**: 105-116.
- García-González, M.; Moreno, J.; Manzano, J. C.; Florencio, F. J.; Guerrero, M. G. 2005. P of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, **115**: 81-90.
- Göksan, T.; Durmaz, Y.; Gökpinar, S. 2003. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). **Aquaculture**, **217**: 431-436.
- Grima, M. E.; Pérez, J. A. S.; Camacho, F. G.; Sánchez, J. L. G.; Fernández, F. G. A.; Alonso, D. L. 1994. Outdoor culture of *Isochrysis galbana* ALII-4 a closed tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, **37**: 159-166.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W. L. & Chanley, M. H. (eds.). **Culture of Marine Invertebrate Animals**. Plenum, New York, USA, p.29-60.
- Guillard, R. R. L.; Lorenzen, C. J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, **8**: 10-14.
- Henrikson, R. 1994. **Microalga Spirulina. Superalimento del futuro**. Ediciones Urano S. A., Barcelona, Spain, 545pp.
- Hoek, V. D.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. 1995. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623pp.
- Krichnavaruk, S.; Loataweesup, W.; Powtongsook, S.; Pavasant, P. 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactor. **Chemical Engineering Journal**, **105**: 91-98.
- Laing, I.; Ayala, F. 1990. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. In: Akatsuka, I. (ed.). **Introduction to applied Phycology**. SPB, The Hague, The Hague, Netherlands, p.447-477.



- Lee, R. E. 1995. **Phycology**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press Cambridge, UK, 645pp.
- López-Eliás, J. A.; Voltolina, D.; Enríquez-Ocaña, F.; Gallegos-Simental, G. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. **Aquacultural Engineering** (in press). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em 9 de maio de 2005.
- Molina, G. E.; Sánchez, P. J. A.; Garcia C. F.; Robles M. A. 1995. The production of polyunsaturated fatty acids by microalgae: from strain selection to product purification. **Process Biochemistry**, **30** (8): 711-719.
- Nieves, M.; Voltolina, D.; Piña, P. 2005. Growth and biomass production of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in standard medium added with three products of zeolitic nature. **Aquacultural Engineering**, **32**: 403-410.
- Okauchi, M. 1991. The status of phytoplankton production in Japan. In: Fulks, W. & Main, K. L. (eds). **Rotifers and microalgae culture systems**. Proceeding of a US-Asia Workshop, The Oceanic Institute, Honolulu, HI, p.247-256.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, **20**: 359-466.
- Pernet, F.; Tremblay, R.; Demers, E.; Roussyd, M. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. Grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**, **221**: 393-406.
- Pindich, R.; Rubinfeld, D. 1981. **Econometric models and economic forecasts**. 2<sup>nd</sup> ed. Mc Graw-Hill, New York, USA, p.475-492.
- Poisson, L.; Ergon, F. 2001. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. **Journal of Biotechnology**, **91**: 75-81.
- Rajadurai, M.; Poornima, E. H.; Narasimhan, S. V.; Rao, V. N. R.; Venugopalan, V. P. 2005. Phytoplankton growth under temperature stress: Laboratory studies using two diatoms from a tropical coastal power station site. **Journal of Thermal Biology**, **30**: 299-305.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 2001. **Biologia Vegetal**. 6<sup>a</sup> ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 906pp.
- Reinfelder, J. R.; Kraepiel, A. M. L.; Morel, F. M. M. 2000. Unicellular C4 photosynthesis in a marine diatom. **Nature**, **407**: 996-999.
- Renaud, S. M.; Thinh, L. V.; Lambrinidis, G.; Parry, D. L. 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, **211**: 195-214.
- Renaud, S. M.; Thinh, L. V.; Parry, D. L. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**, **170**: 147-159.
- Richmond, A. 1990. Outdoor mass cultures of microalgae: Biological principles, production systems. In: Richmond, A. (ed.). **CRC Handbook of microalgal mass culture**. CRC Press, Florida, USA, p.285-330.
- Richmond, A. (ed). 2004. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Blackwell Science, Oxford, UK, 566pp.
- Rocha, J. M. S.; Garcia, J. E. C.; Henriques, M. H. F. 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, **20**: 237-242.
- Rodolfi, L.; Zitelli, G. C.; Barsanti, L.; Rosati, G.; Tredici, M. R. 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, **20**: 243-248.
- Saavedra, M. P. S.; Voltolina, D. 1994. The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (Bacillariophyceae) under different light conditions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **1**: 39-44.
- Scragg, A. H.; Illman, A. M.; Crden, A.; Shales, S. W. 2002. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass e Bioenergy**, **23**: 67-73.
- Stein, J. R. (ed.) 1973. **Handbook of Phycology methods. Culture, Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press, London, UK, 448pp.
- Tomaselli, L. 2004. The microalgal cell. In: Richmond, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology**. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 3-19.
- Tzovenis, I.; De Pauw, N.; Sorgeloos, P. 2003. Optimisation of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. **Aquaculture**, **216**: 203-222.
- Valenzuela-Espinoza, E.; Millan-Nunez, R.; Nunez-Cabrero, F. 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquaculture Engineering**, **25**: 207-216.
- Voltolina, D.; Nieves, M.; Navarro, G., Oliva, T.; Peraza, D. 1998. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalga growth. **Aquacultural Engineering**, **19**: 7-15.
- Vonshak, A. 1990. Recent advances in microalgal biotechnology. **Biotechnology Advances**, **6**: 709-727.
- Vonshak, A. 1997. **Spirulina platensis (Arthrospira)**. Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, Taylor e Francis, London, UK, 233pp.
- Xie, J.; Zhang, Y.; Li, Y.; Wang, Y. 2001. Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis*. **Journal Applied Phycology**, **13**: 343-347.